粉葛 *PtCHI* 基因的克隆、原核表达和亚细胞定位

羽健宾[1,2]， 郭丽君[1]， 张静[1]， 肖冬[1]， 何龙飞[1]，王爱勤[1*]
（1.广西大学农学院，南宁 530004；2. 华南农业大学生命科学学院，广州 510642）

摘要： 为探究葛根品种间异黄酮类物质代谢关键酶基因 *PtCHI* 分子机制差异，以初步揭示其品种间异黄酮物质含量差异原因。该研究分别以野葛品种和粉葛品种“桂葛 1 号”为材料，经乙醇提取并通过高效液相对野葛和粉葛中葛根素和总黄酮的含量进行测定；基于已报道的野葛 *CHI* 基因，通过同源克隆方法分离粉葛中 *PtCHI* 基因，并在体外进行蛋白表达，同时在拟南芥原生质体中研究 *PtCHI* 基因的定位。结果表明：（1）野葛中的葛根素含量显著高于粉葛，且野葛的总黄酮含量也高于粉葛但不达显著水平；（2）成功分离粉葛 *PtCHI* 基因，长度为 742 bp 且包含 672 bp 完整的 ORF 框，编码 223 个氨基酸，与野葛的 *CHI* 基因具有 99%的同源性；（3）*CHI* 基因在粉葛中的表达量为茎>根>叶子，野葛中则为根>茎>叶子；此外除了叶子，野葛中的 *CHI* 基因的表达量均显著高于粉葛；（4）预测为稳定的亲水性蛋白且大小为 27.8 kD，二、三级结构以α-螺旋为主，具有 25 个磷酸化位点，与野葛、大豆和乌拉尔甘草的亲缘关系较近，和 F3H2、F3H、4CL4、DFR2 及 CHS 发生互作的可能性较大；（5）在体外成功诱导并分离到 27.8 kD 的 PtCHI 单一蛋白；（6）通过拟南芥原生质体进一步揭示 *PtCHI* 主要定位在叶绿体。该研究为进一步解析粉葛和野葛中的黄酮类物质含量差异的问题，以及 *PtCHI* 的功能验证和异黄酮代谢途径机理研究奠定基础。

关键词： 粉葛，*PtCHI*，克隆，原核表达，亚细胞定位

中图分类号： Q943　　**文献标识码：** A　　**文章编号：**

Cloning, Prokaryotic Expression and Subcellular Localization of *PtCHI* Gene from *Pueraria thomsonii*

YU Jianbin[1,2], GUO Lijun[1], ZHANG Jing[1], XIAO Dong[1], HE Longfei[1], WANG Aiqin[1 *]
（1. *College of Agriculture*, *Guangxi University*, Nanning 530004, China;
2. *College of Life Sciences*, *South China Agricultural University*, Guangzhou 510642, China）

基金项目： 国家自然科学基金（81860670）；国家现代农业产业技术体系-广西薯类创新团队首席专家项目（nycytxgxcxtd-11-01）[Supported by National Natural Science Foundation of China(81860670); Chief Expert of Yam Innovation Team in Guangxi; National Modern Agricultural Industry Technology System of China (nycytxgxcxtd-11-01)]。

第一作者： 羽健宾(1993-)，博士研究生，研究方向为药用植物次级代谢产物调控研究，（E-mail）ybb1129@126.com。

*__通信作者：__ 王爱勤，博士，教授，研究方向为主要从事药用植物的栽培与调控研究，（E-mail）waiqing1966@126.com。

Abstract: In order to explore the difference in the molecular mechanism of the variety Puerarial between isoflavones metabolic enzyme genes *PtCHI*, to preliminarily reveal the difference content of the isoflavones. The material of this study is *Pueraria montana* and *Pueraria thomsonii*. Puerarin and total flavonoids of *Pueraria montana* and *Pueraria thomsonii* were extracted by ethanol, and their content was measured by high-performance liquid phase. Based on the CDS sequence of the *CHI* gene of *Pueraria montana*, the *PtCHI* gene from *Pueraria thomsonii* was isolated by homologous cloning, and the protein was expressed *in vitro*. At the same time, the location of the *PtCHI* gene was studied in Arabidopsis protoplasts. The results were as follows: (1)The content of puerarin in *Pueraria montana* is significantly higher than the *Pueraria thomsonii*, and the content of total flavonoid was also, but not significant. (2)Successfully isolated the gene *PtCHI* from *Pueraria thomsonii*. The gene was 742 bp in length, contains a complete ORF frame of 672 bp, encodes 223 amino acids, and has up to 99% homology with *Pueraria montana*; it was predicted to be a stable hydrophobic protein with a size of 27.8 kD. (3)This study found that the expression of *CHI* gene in *Pueraria thomsonii* was stem> root> leaves, *Pueraria thomsonii* was root> stem> leaves. The expression of *CHI* genes from *Pueraria thomsonii* was significantly higher than *Pueraria thomsonii* besides in leaves; (4) Through the online tool prediction analysis, PtCHI was found to be stable hydrophilic protein and the size was 27.8 kD. The secondary and tertiary structures were based on α-Helix-based, with 25 phosphorylation sites, closely related *Pueraria montana*, *Glycine max* and *Glycyrrhiza uralensis*, and were more likely to interact with F3H2, F3H, 4CL4, DFR2 and CHS.(5)At the same time, the protein of PtCHI was successfully induced and isolated *in vitro*, with a single protein of 27.8 kD, respectively. (6) Through the Arabidopsis protoplasts revealed that *PtCHI* was only located in the chloroplasts. This study is in further analyzing the difference in flavonoids in *Pueraria montana* and *Pueraria thomsonii*, as well as laying the foundation for the functional verification of *Pueraria thomsonii PtCHI* and the research on the mechanism of isoflavone metabolism.

Keywords: *Pueraria thomsonii*, *PtCHI*, cloning, prokaryotic expression, subcellular localization

粉葛(*Pueraria thomsonii*)为豆科蝶形花亚科葛属藤本植物甘葛藤的干燥根，茎基部木质且具有肥厚的块状茎，在我国广泛分布（中国植物志，1995）。其主要活性成分包括异黄酮类化合物葛根素、大豆苷元、染料木素及异甘草素等，以及皂苷类物质皂角精醇、槐二醇和大豆苷醇等（楚纪明等，2015）。另外粉葛中还富含维生素 C、蛋白质、还原糖、淀粉和膳食纤维等营养成分（李桂花等，2021）。粉葛作为“药食同源”作物，因其淀粉含量高，常被加工成葛根粉、葛根薯片、葛根糕、葛根酒等系列商品，同时前人研究也表明粉葛具有解热、抗病毒、降血糖血脂血压、保肝护肝、抗肿瘤、改善肾功能等作用（尚小红等，2021；于钦辉等，2021）。

查尔酮异构酶（chaleone isomerase, CHI）是异黄酮代谢途径中的一个关键酶，其酶活与植物体内黄酮的积累有着重要作用，从而对植物的抗逆、花色等存在关联（李琳玲等，2008；周发俊等，2008）。*CHI* 是个超基因家族，现主要分为 Type I 类、Type II 类和 Type III 类三个类型，大部分植物的 *CHI* 基因属于 Type I 类型，Type II 型一般只存在于豆科植物且该类型是由 Type I 演化而来，Ty pe III 类主要为真菌和细菌中的类 CHI 蛋白家族（张党权等，2007；梁瓴婕，2016）。目前 *CHI* 基因已在多种植物中成功分离并做功能验证。梁瓴婕（2016）

在体外成功分离香雪兰的 FhCHI1、FhCHI2、FhCHI3、FhCHI4、FhCHI5 蛋白，并通过酶活检测得出 FhCHI2 和 FhCHI5 具有活性，能催化柚皮素查尔酮形成柚皮素，而 FhCHI3、FhCHI4 则没有活性；同时在拟南芥中异源表达 *FhCHI1*、*FhCHI2*、*FhCHI5*，发现能恢复 *CHI* 突变体拟南芥的花色苷和黄酮醇代谢，并且能使植株幼苗的生长点恢复为紫色，也使种皮颜色变回棕色；而 *FhCHI3*、*FhCHI4* 则不能恢复突变体的表型及花色苷、黄酮醇代谢。郭晋雅（2011）将紫心甘薯 *IbCHI* 基因转化至拟南芥突变体中，结果表明甘薯 *IbCHI* 基因能使突变体拟南芥（tt5）种皮颜色由浅黄色恢复到野生型的深粽褐色；强光处理下突变体植株的叶片荧光参数 Fv/Fm 和 Yield 迅速降低，而转 *IbCHI* 的植株和 CK 变化较慢，表明 *IbCHI* 能使突变体恢复至与 CK 一样的抵抗强光的效果；干旱处理后突变体植株萎蔫，而转 *IbCHI* 的植株和 CK 植株的枯萎程度较低。何则铭（2011）研究表明，在 NaCl（150 mmol·L^{-1}）处理下，过表达 *GmCHI4A* 和 *GmCHI4B* 的大豆发状根耐盐性高于对照，并且转基因株系中的 *GmSOD1* 和 *GmSOS1* 表达量以及发状根中的异黄酮含量显著高于对照。通过对前人的研究发现，*CHI* 基因在细胞中的定位是多样化的，而且同为 *CHI* 基因在不同物种中的定位存在差异。郭丹丹（2019）研究表明，红花 *CtCHI1* 基因定位于细胞核。李红艳（2019）发现丹参 *SmCHI* 基因不仅定位在烟草表皮细胞的高尔基体、 质膜和细胞核上，而且在内质网、过氧化物酶体和质体上也检测到荧光。

本研究以前期在野葛和粉葛中葛根素及总黄酮的含量存在显著差异为研究区域，根据前人在其他物种中发现查尔酮异构酶是黄酮代谢途径中的关键酶，在黄酮类化合物合成中起到重要作用。依托 Yoshiya Terai 等 (1996)在野葛(*Pueraria montana*)中成功克隆到一个长 756 bp 的 *CHI* 基因，该基因包含长 675 bp 的 ORF 框，编码 225 个氨基酸，蛋白大小 23 803 Da。本研究将通过同源克隆的方法、用 IPTG 体外诱导和分离蛋白，同时通过拟南芥原生质体。拟探讨以下问题：（1）*CHI* 基因在粉葛和野葛中是否存在差异？（2）*CHI* 基因在野葛和粉葛中的表达量情况如何？（3）*CHI* 基因在细胞中的定位在哪？本研究结果将为野葛与粉葛中葛根素含量和总黄酮含量差异的探讨提供信息，同时也为进一步解析 *PtCHI* 基因在粉葛中调控黄酮类化合物积累的机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料选用本课题选育的食用型粉葛(*Pueraria thomsonii* Benth.)品种“桂葛 1 号”，种植于广西大学农学院植物标本园内。

1.2 粉葛与野葛的葛根素和总黄酮含量检测

称取葛根粉样品 0.1 g 于盛有 50 mL 乙醇（30%）的锥形瓶中，保鲜膜封口并称重后 250 W 超声 30 min ，待室温冷却后再称重，用 30%乙醇补足失重，过滤后吸取 5 mL 滤液于 25

mL 容量瓶且用 30%乙醇定容，即为 20 μg·mL^{-1} 的葛根素提取液。流动相为甲醇：0.1%醋酸水=30:70，流速为 1.0 mL·min^{-1}，检测波长 250 nm。

葛根总黄酮的提取和检测均参照李增富和吴荣锋 (2008) 的方法测定。

1.3 粉葛 *PtCHI* 基因的克隆和表达量检测

提取“桂葛 1 号”的总 RNA，并获得 cDNA，用表 1 中引物 PtCHI-F 和 PtCHI-R 进行 PCR 扩增，纯化后连接到 pMD-19 T 载体，转入 DH5α 感受态细胞，挑选菌液扩增后有特异条带的菌液送往生物公司测序，在 DNA MAN 中完成序列比对，完成克隆。用表 1 中引物 PtCHI-DLF 和 PtCHI-DLR 对 *CHI* 基因在野葛和粉葛中做表达量检测。

1.4 粉葛 *PtCHI* 基因的生物信息学分析

利用在线工具 NCBI 中的 ORF Finder 找到基因的开放阅读框；使用 ProtParam 在线预测蛋白的理化性质；利用在线工具 SOPMA、SWISS-MODEL 及 WoLF PSORT 分别进行蛋白二级、三级结构预测和亚细胞定位的预测；NetPhos 3.1 Server 在线预测磷酸化位点；利用 STRING 软件，以大豆蛋白数据库分析蛋白之间的互作关系；随后利用软件(MEGA 7.0)构建系统进化树。

1.5 原核表达及 western blot 验证

用表 1 中的引物 PtCHI-YHF、PtCHI-YHR 将克隆完成的目的基因的 ORF 框纯化后与线性化载体 pet-28a 相连得到重组子 pet28a-*PtCHI*。用 IPTG 诱导后，经 SDS-PAGE 电泳分析为可溶性表达的蛋白，根据亲和层析原理，使用 Protein Ni-NTA Resin 进行镍柱纯化。对纯化后的蛋白进行 western blot 验证，使用的一抗为抗 His 标签鼠单克隆抗体，二抗为山羊抗小鼠 IgG（H+L）。

1.6 亚细胞定位

用表 1 中的引物 PtCHI-YXBF 和 PtCHI-YXBR 将克隆完成的目的基因的 ORF 框纯化后与线性化载体 pSAT6-EYFP-N1 相连得到 pSAT6-EYFP-N1-*PtCHI* 重组质粒。选取苗龄在 25 d 的拟南芥幼嫩叶片，通过酶（25% Cellulase R10 和 0.3% Mecerozyme R10）消化已切成细条的拟南芥叶片约 3-4 h，经尼龙膜过滤后用洗涤液洗涤从而获取拟南芥原生质体；然后通过与原生质体和质粒总体积相等的 20% PEG4000 进行转化，转化结束后转移至 96 孔板中培养，待其培养结束即可制片，在共聚焦显微镜下采集图像。

表 1 表达载体构建的特异引物

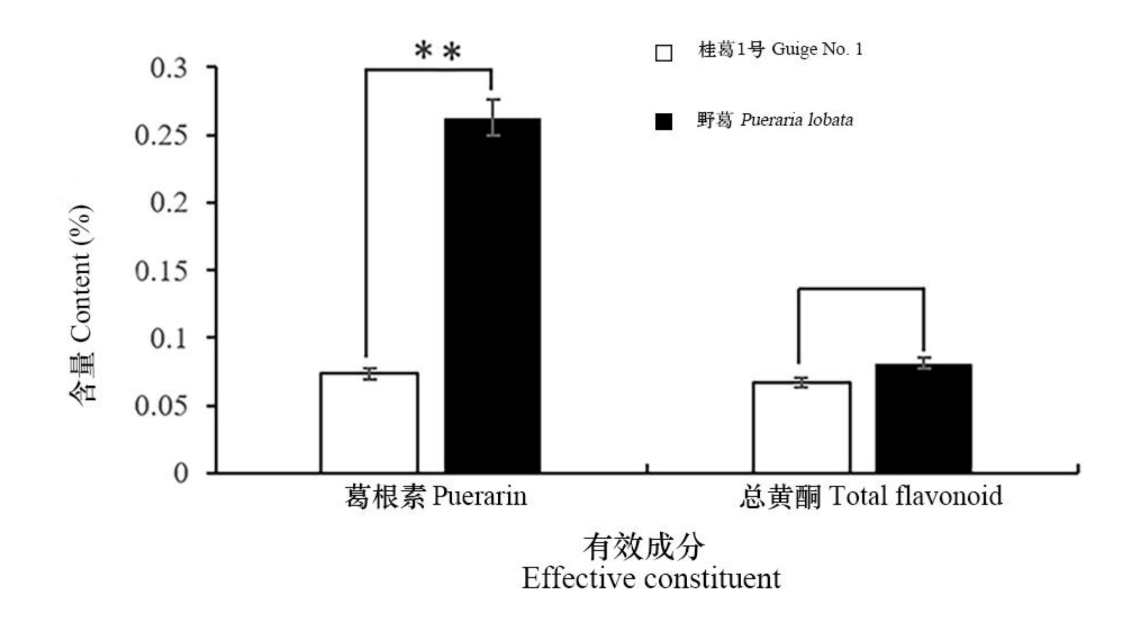
Table 1 Specific primers for expression vector construction

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
PtCHI-F	GATCGAAACCCTTAATTTCA
PtCHI-R	ATCACTTTCCCTCAACTCAG
PtCHI-DLF	CAGCAGCAGTAGCAACCATC
PtCHI-DLR	CGAGTGATGACACCGCTTTA
PtCHI-YHF	cagcaaatgggtcgcggatccATGGCGGCAGCAGCAGCA
PtCHI-YHR	gtggtggtggtggtgctcgagGACTATAATGCCGTGGCTCAATAC
PtCHI-YXBF	ggtccggactcagatctcgagCATGGCGGCAGCAGCAGCA
PtCHI-YXBR	gctcaccatcaggatcccgggGACTATAATGCCGTGGCTCAATAC

2 结果与分析

2.1 粉葛和野葛的葛根素和总黄酮含量测定

由图 1 可看出，野葛中的葛根素含量显著高于粉葛（桂葛 1 号），是粉葛的 3.5 倍左右；并且野葛的总黄酮含量也高于粉葛，但差异不显著。



**表示在 0.01 水平上显著差异。

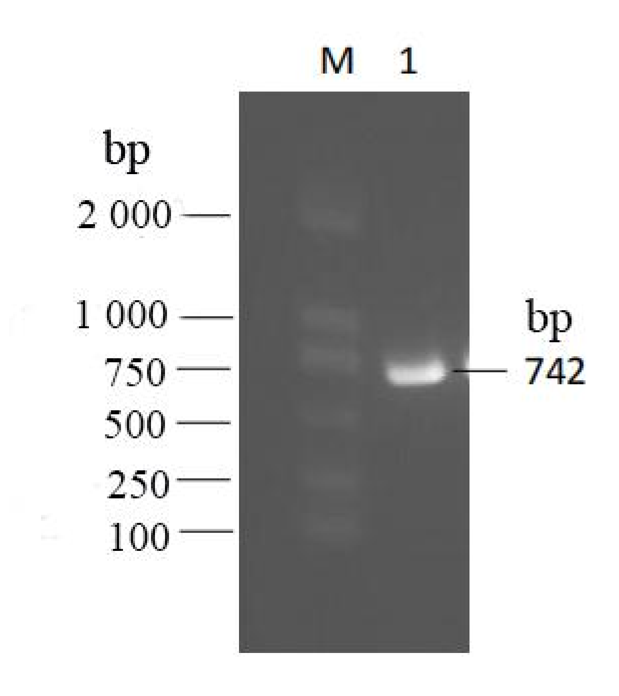
** indicates significant difference at 0.01 level.

图 1 葛根素和总黄酮的含量

Fig. 1 Content of Puerarin and total flavonoids

2.2 粉葛 *PtCHI* 基因的克隆与表达量分析

根据已报道的野葛 *CHI* 基因序列设计引物，以粉葛叶片 cDNA 为模板，克隆到 *PtCHI* 基因片段（图 2）。该 cDNA 核苷酸序列长 742 bp，具有一个 672 bp 完整的开放阅读框，启动子 ATG 位于 55 bp，终止子 TGA 位于 726 bp，推导编码 223 个氨基酸（图 3）。经 NCBI 网站 blast 比对，所克隆的片段与野葛的 *CHI* 基因编码的蛋白具有 99%的同源性。*CHI* 基因表达量结果显示，*CHI* 基因在野葛中的表达量为：根>茎>叶，而粉葛中则为茎>根>叶；另外除了叶片，野葛中 *CHI* 基因的表达量均显著高于粉葛（图 4）。



M. DL2 000 bp DNA Marker; **1**. *PtCHI* 基因的 PCR 产物。

M. DL2 000 DNA Marker; **1**. PCR product of *PtCHI* gene.

图 2 葛根 *PtCHI* 基因的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of *PtCHI* gene from *Pueraria*

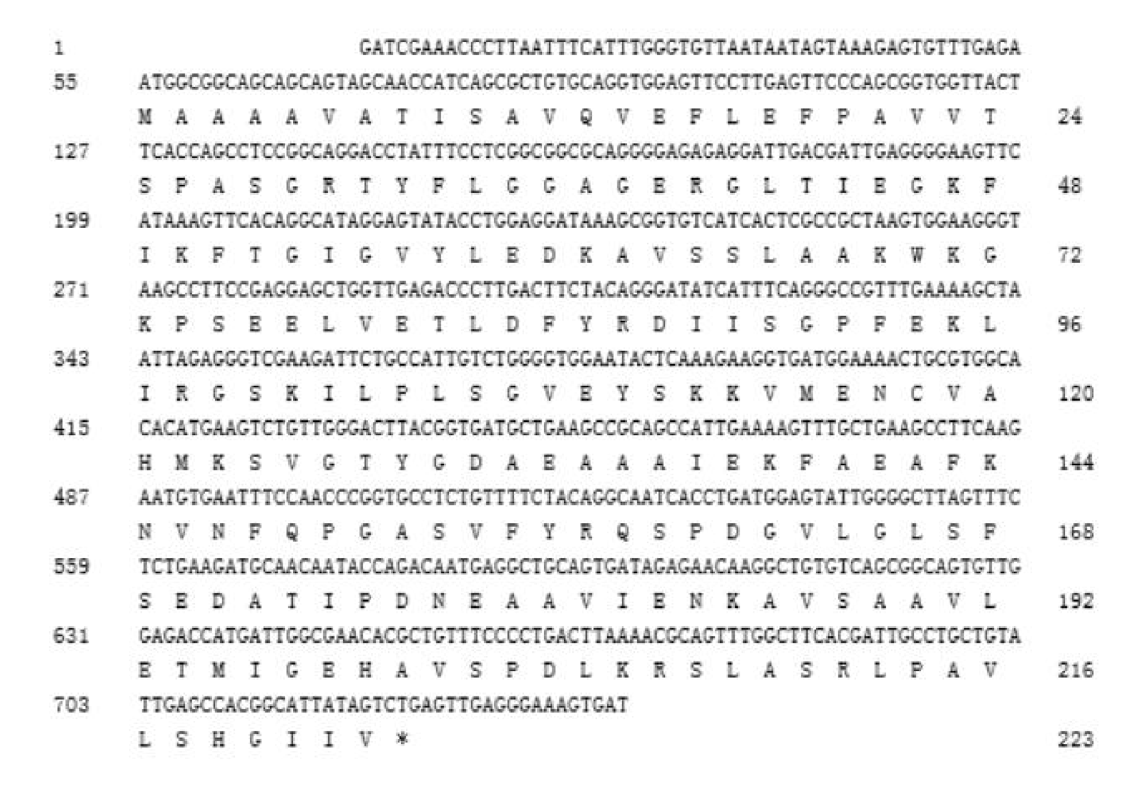
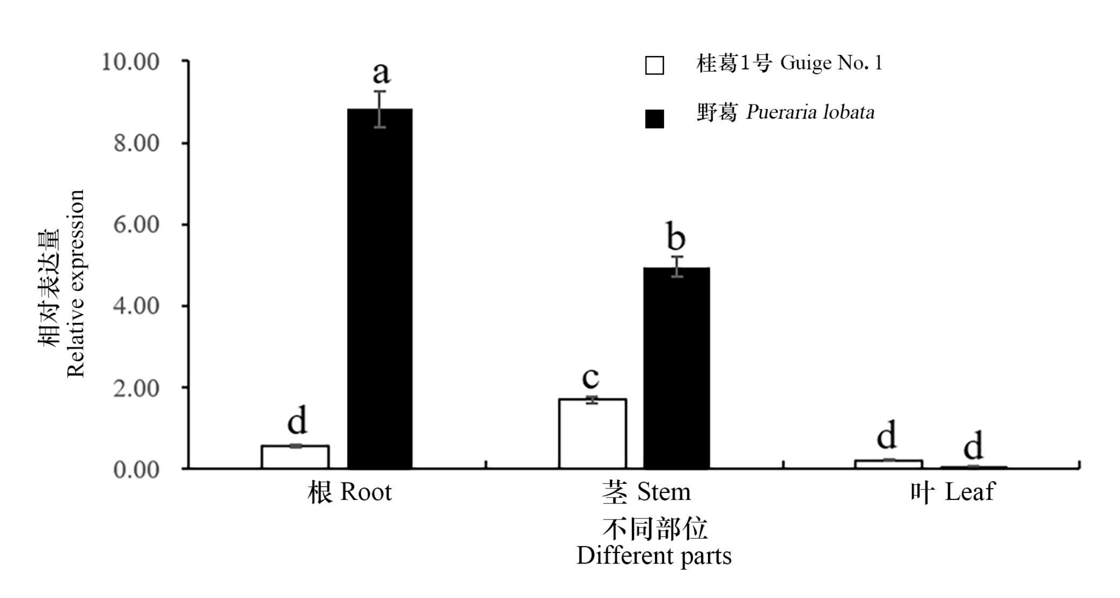


图 3 粉葛 *PtCHI* 基因的 cDNA 序列及推测的氨基酸序列

Fig. 3 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *PtCHI* gene



不同部位不同小写字母表示差异达显著水平（$P<0.05$）。

Different lowercase letters in different parts represent significant differences ($P<0.05$）.

图 4 *CHI* 基因在不同部位的表达量

Fig. 4 Expression of *CHI* genes in different parts

2.2 粉葛 PtCHI 蛋白生物信息学分析

2.2.1 PtCHI 蛋白的理化性质及亚细胞定位预测

理化性质预测结果表明，PtCHI 蛋白由 224 个氨基酸组成，相对分子质量为 27.8 kD，理论等电点（PI）是 5.34，不稳定指数是 32.25，属于稳定蛋白，脂肪族指数为 95.40。PtCHI 蛋白中带负电荷残基占氨基酸总数的 12.05%，而带正电荷残基为 9.82%，推测该蛋白带负电。亚细胞定位预测结果显示，定位在细胞质的可能性达 64.28%，其次是叶绿体 14.28%，而定位于细胞核、线粒体和高尔基体的几率是 7.14%。

2.2.2 PtCHI 二级、三级结构预测

通过 SOPMA 线上工具对 PtCHI 蛋白二级结构进行分析，预测结果显示该蛋白二级结构的形式及其所占比例分别是：α-螺旋占比最高，其次是无规则卷曲和延伸链这两种二级结构，所占比例分别为 48.66%、24.11%和 17.41%，而β-转角占比最低即 9.82%（图 5）。SWISS-MODEL 预测 PtCHI 蛋白三级结构，发现该蛋白的结构也是包括α-螺旋、延伸链、β-转角和无规则卷曲，其中以α-螺旋居多，与二级结构预测结果相符（图 6）。

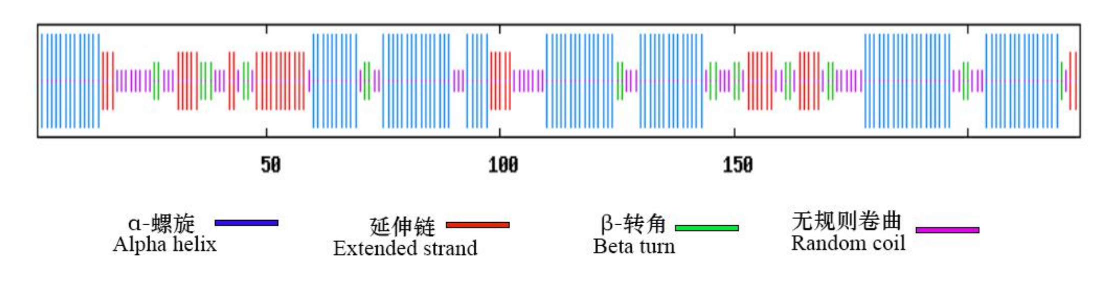


图 5　PtCHI 蛋白的二级结构

Fig. 5 Secondary structure prediction of PtCHI protein

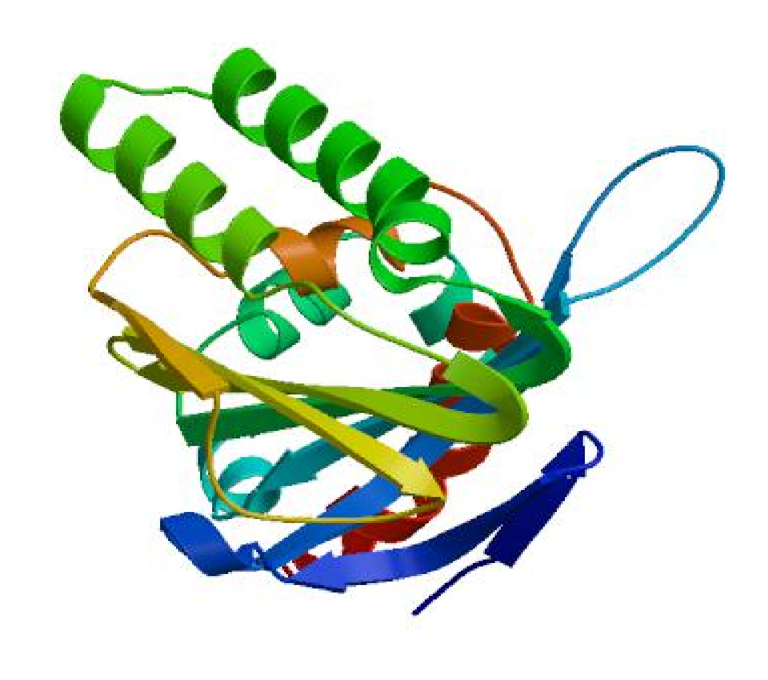


图 6　PtCHI 蛋白的三级结构预测

Fig. 6 PtCHI tertiary structure prediction

2.2.3 PtCHI 磷酸化位点预测

NetPhos 3.1 Server 在线预测 PtCHI 磷酸化位点，结果显示，该蛋白主要存在 25 个磷酸化位点，其中发生磷酸化可能性最大是位于 107 位的丝氨酸和 169 位的脯氨酸，得分分别是 0.969 和 0.964；其次是位于 29 位和 203 位的丝氨酸，得分为 0.901 和 0.902；接着是第 26 位的丝氨酸、44 位的苏氨酸、101 位的丝氨酸和 112 位的丝氨酸，得分分别为 0.894、0.863、0.844、0.827（图 7）。

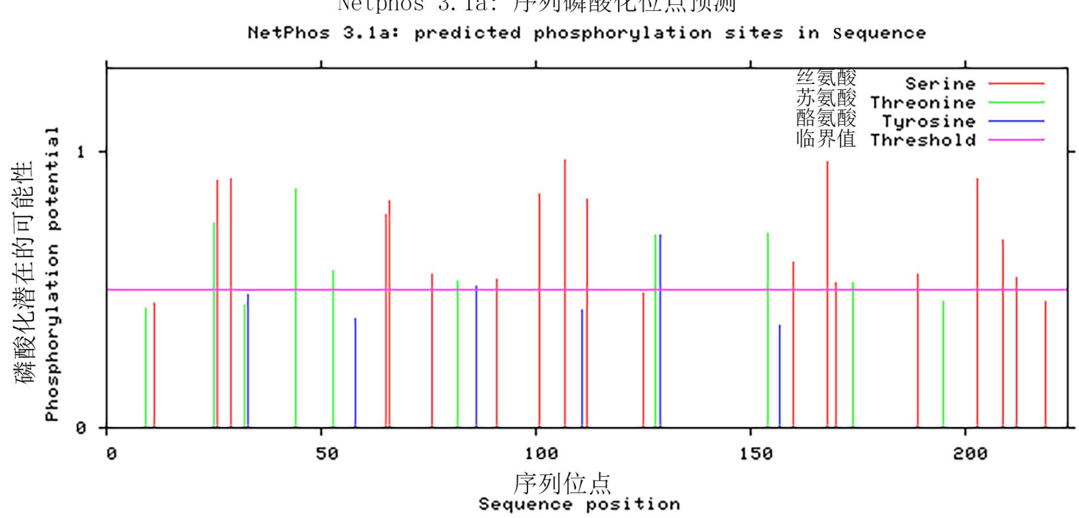


图 7　PtCHI 蛋白磷酸化位点预测

Fig. 7 Phosphorylation site prediction of PtCHI protein

2.2.4 PtCHI 的遗传进化树分析

通过 MEGA 7.0 软件，构建 PtCHI 的氨基酸系统发育进化树，结果表明，11 个物种被分为两大类，其中桂葛 1 号 PtCHI 和野葛（*Pueraria montana*）、大豆（*Glycine max*）、乌拉尔甘草（*Glycyrrhiza uralensis*）、刺毛黧豆（*Mucuna pruriens*）和密花豆（*Spatholobus suberectus*）为一组，而菜豆（*Phaseolus vulgaris*）、绿豆（*Vigna radiata*）和豇豆（*V. unguiculata*）为一组，鸡母珠（*Abrus precatorius*）和拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）为一组。说明桂葛 1 号 PtCHI 与野葛、大豆和乌拉尔甘草亲缘关系较近（图 8）。

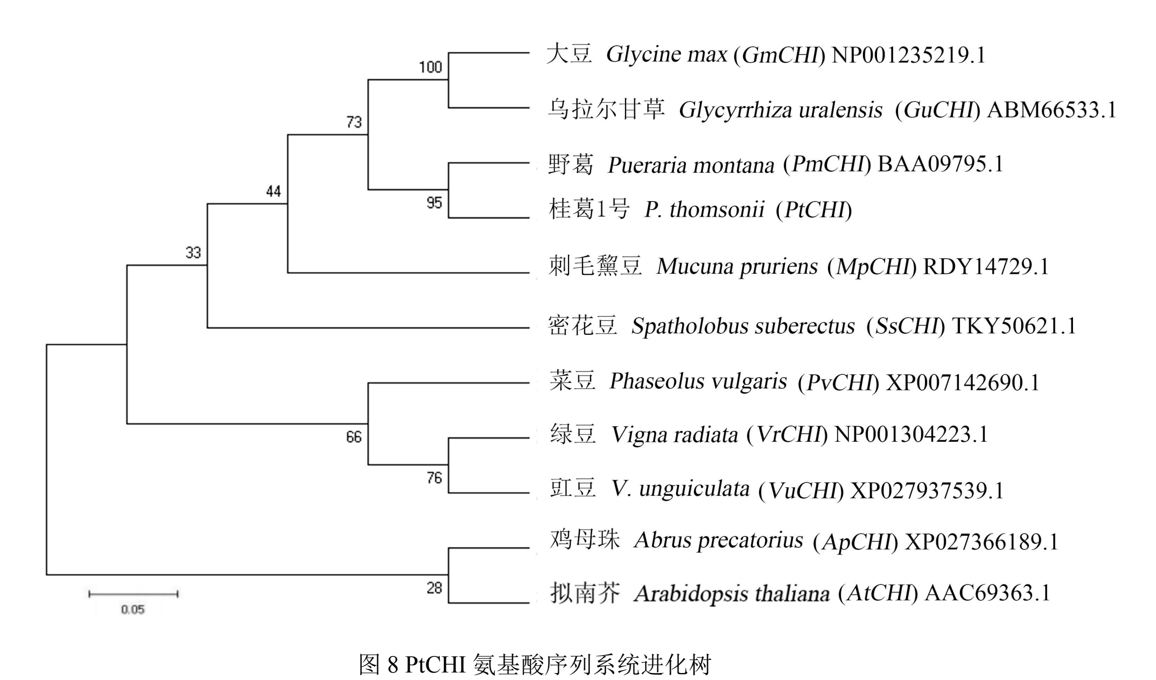


图 8 PtCHI 氨基酸序列系统进化树

Fig. 8 Phylogenetic analysis of PtCHI amino acid sequence

2.2.5 PtCHI 蛋白互作关系预测

利用 STRING 在线工具，并以大豆蛋白库分析大豆 CHI 的互作关系，预测结果显示 CHI 蛋白与黄烷酮 3-羟化酶 F3H2、F3H（属于铁/抗坏血酸依赖的氧化还原酶家族，与植物类黄酮化合物花青素和原花青素的积累相关）的互作分数较高，均为 0.994；其次是 CHI 蛋白与对-香豆酰 CoA 连接酶 4CL4（属于 ATP 依赖的 AMP 结合酶家族，与植物木质素合成密切相关），互作分数为 0.980；CHI 蛋白还与二氢黄酮醇还原酶 DFR2（与花色苷积累相关）互作，互作分数为 0.974；此外还与 SF3’H1（属于细胞色素 P450 家族，与花青素积累相关）及查尔酮合成酶 CHS8（属于查尔酮/二苯乙烯合成酶家族，与植物查尔酮类化合物积累、花色素形成及植物防御相关）发生互作，互作分数分布为 0.956、0.952（图 9）。

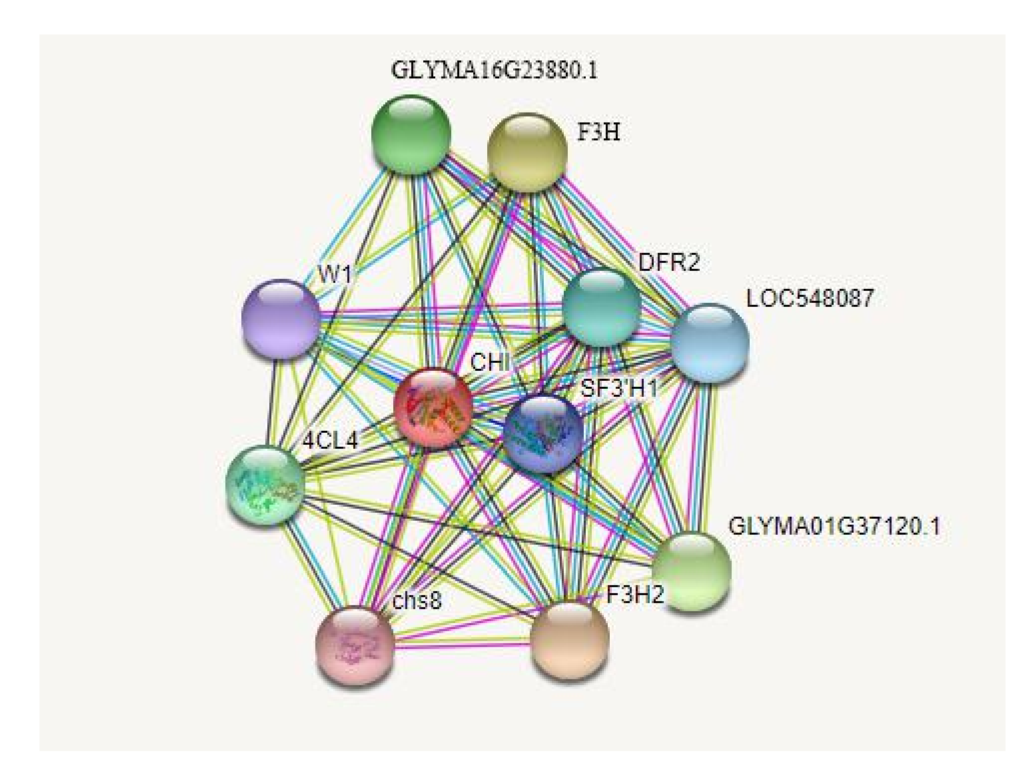


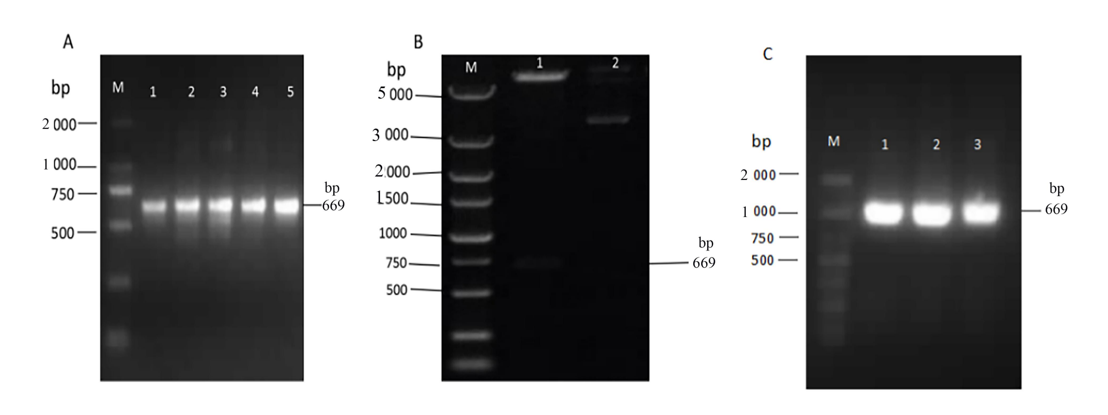
图 9 PtCHI 蛋白互作分析

Fig. 9 PtCHI protein interaction analysis

2.3 原核表达分析

2.3.1 原核表达载体构建

由图 10A 可知，在表 1 特异引物下，经 PCR 扩增后，分别获得了约 669 bp 的产物，与目的基因大小相符。将扩增产物与线性化的 pet28a 载体进行重组反应，并转化至 DH5α。提取质粒，分别用限制性内切酶 XhoⅠ、SpeⅠ酶切，结果如图 10：B 所示，分别在大小约 5 300 bp 和 669 bp 处各有一明亮条带。将测序正确的质粒转化至 BL21 感受态细胞，经 PCR 再次验证，证明目的基因已成功连接至载体（10：C）。说明获得了含 pet28a-*PtCHI* 重组质粒的原核表达菌株。



A. *PtCHI* 基因 PCR 扩增；**1-5**. 扩增产物。**B** **1**：重组质粒 pet28a-*PtCHI* 的双酶切产物；**2**. pet28a-*PtCHI* 质粒提取。**C**. 重组质粒 pet28a-*PtCHI* 导入 BL21 中的 PCR 检验结果 **1-3**. 扩增产物。**M**. DL2 000 Marker。

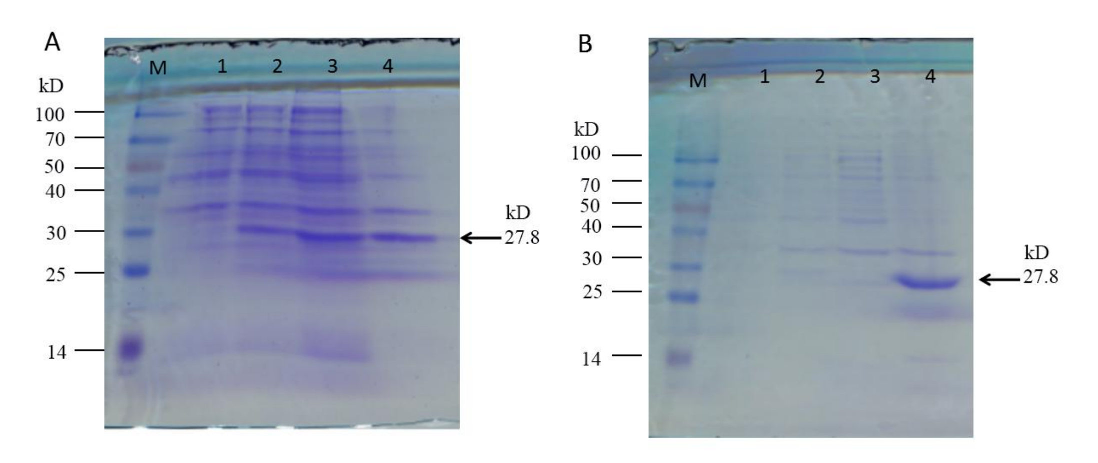
A. PCR amplification of *PtCHI* **1-5**. Amplification products. **B** **1**: Digestion of pet28a-*PtCHI*; **2**. Plsmid DNA. **C**. PCR amplification of recombinant plasmid pet28a-*PtCHI* **1-3**. Amplification products. **M**. DL2 000 Marker.

图 10 原核表达载体 pet28a-*PtCHI* 的构建

Fig. 10 Construction of prokaryotic expression vector pet28a-*PtCHI*

2.3.2 重组蛋白诱导表达

将含有 pet28a-*PtCHI* 重组质粒的菌株，在 0.5 mM IPTG 条件下并置于 16 ℃和 30 ℃环境中培养，在 30 kD 处有特异蛋白条带出现，与目的蛋白大小相符，而无 IPTG 诱导时无此特异性蛋白条带，表明 pet28a-*PtCHI* 蛋白在 BL21 表达菌株中被成功诱导表达。其中，SDS-PAGE 检测结果表明，高温诱导下上清中存在较少的可溶性蛋白，表明低温能够促进该蛋白的可溶性表达（图 11）。



A. 16 ℃，100 rpm，0.5mM IPTG 诱导下的 PtCHI； **B**. 30 ℃，100 rpm，0.5 mM IPTG 诱导下的 PtCHI；**M**. Protein marker；**1**. 未诱导的总蛋白；**2**. IPTG 诱导的总蛋白；**3**. IPTG 诱导的上清；**4**. IPTG 诱导的沉淀。

A. Induction conditions are 16 ℃, 100 rpm, 0.5 mM IPTG of PtCHI; **B**. Induction conditions for 30 ℃, 100 rpm, 0.5 mM IPTG of PtCHI;**M**. Protein marker; **1**. Total uninduced protein; **2**. Total protein induced by IPTG ; **3**. IPTG-induced supernatant; **4**. IPTG-induced precipitation.

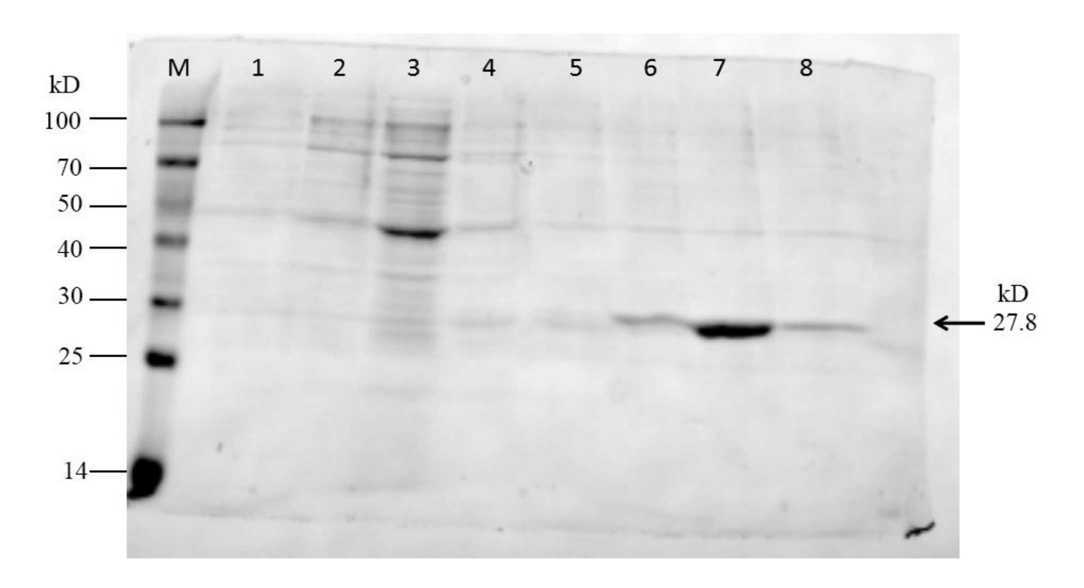
图 11 PtCHI 原核表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 11 SDS-PAGE electrophoresis analysis of prokaryotic expression of PtCHI

2.3.3 重组蛋白的纯化及浓度测定

因镍离子能够与蛋白组氨酸中的咪唑环结合，因此利用镍离子金属螯合亲和层析介质（Ni-NTA）能够吸附含组氨酸的蛋白质。通过增加流动相的咪唑浓度，可将蛋白进行替换洗脱，从而达到分离纯化蛋白的目的。由图 12 可知，采用镍亲和层析法能够对 PtCHI 重组蛋白进行有效的分离纯化。当咪唑浓度较低时（20-100 mM），杂蛋白被去除，浓度达 120 mM 以上时目的蛋白被替换洗脱。当咪唑浓度提高至 160 mM，蛋白条带较为单一，表明此时蛋

白纯度较高。将纯度高的蛋白进行 buffer 置换，测得其 PtCHI 蛋白浓度为 6.39 μg·μL-1。



M. Protein marker；**1**. 流出液；**2**. 20 mM 咪唑；**3**. 40 mM 咪唑；**4**. 80 mM 咪唑；**5**. 100 mM 咪唑；**6**. 120 mM 咪唑；**7**. 160 mM 咪唑；**8**. 200 mM 咪唑。。

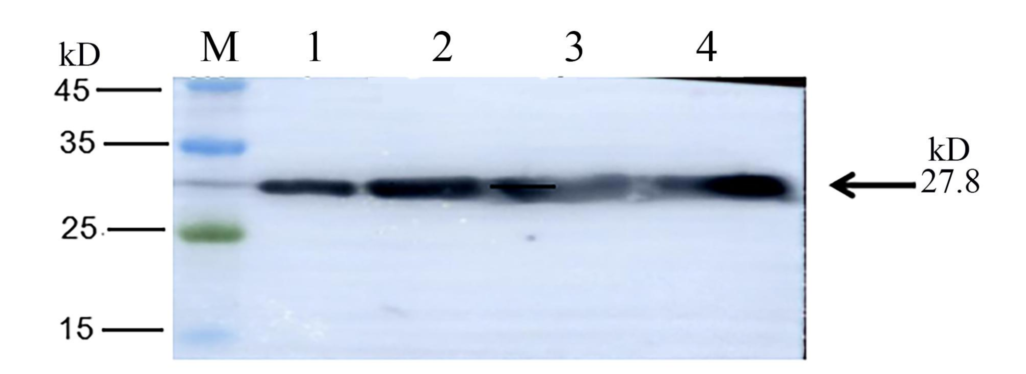
M. Protein marker; **1**. Eluate; **2**. 20 mM imidazole; **3**. 40 mM imidazole; **4**. 80 mM imidazole; **5**. 100 mM imidazole; **6**. 120 mM imidazole; **7**. 160 mM imidazole; **8**. 200 mM imidazole.

图 12 PtCHI 重组蛋白的纯化

Fig. 12 Purification of PtCHI recombinant protein by Ni-affinity chromatography

2.3.4 纯化蛋白的 Western Blot 验证

由于 pet28a 载体质粒上带有组氨酸标签，可以用 His 抗体对纯化蛋白进行 Western blot 检测。由图 13 可知，经曝光后，PtCHI 在 PVDF 膜上约 27.8 kD 处有目的蛋白条带出现。不同蛋白上样量均检测到特异的蛋白条带，进一步证实分离纯化的蛋白为 PtCHI 蛋白。



M. Protein marker；**1**. 上样量 10 ng；**2**. 上样量 20 ng；**3**. 上样量 30 ng；**4.** 上样量 50 ng。

M. Protein marker; **1**. Sample loading 10 ng; **2**. Sample loading 20 ng; **3**. Sample loading 40 ng ; **4**. Sample loading 50 ng.

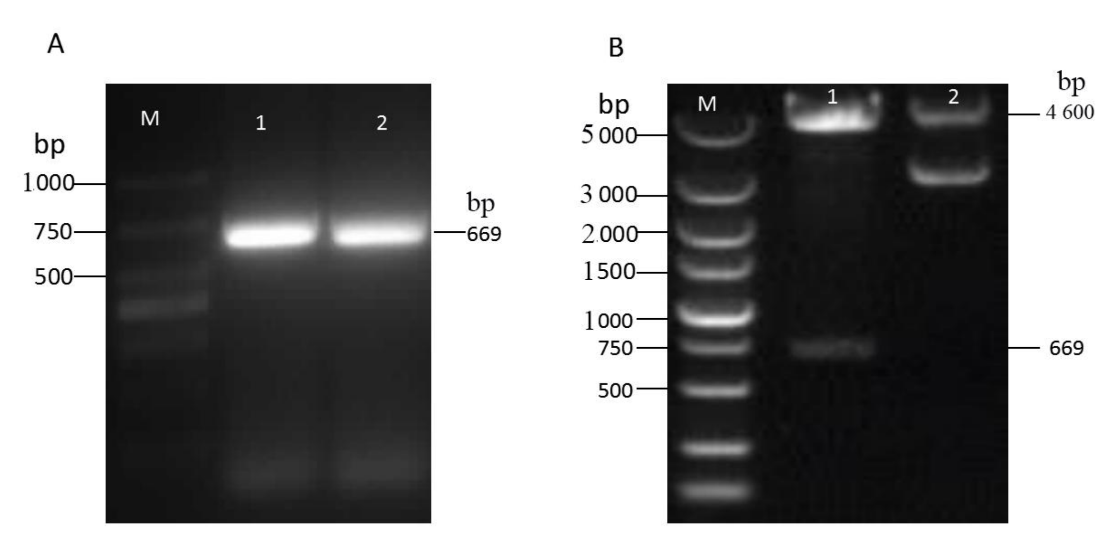
图 13 PtCHI 重组蛋白的 WB 检测

Fig. 13 Western blot analysis of PtCHI recombinant protein

2.4 亚细胞定位

2.4.1 亚细胞定位表达载体构建

利用表 1 中的特异引物 PtCHI-YXBF/R 进行 PCR 扩增，经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测，分别在 669 bp 处有单一条带，与目的基因大小相一致（图 14A）。经纯化后与线性化载体 pSAT6-EYFP-N1 连接，并转化至 DH5α感受态细胞中。提取质粒经限制性内切酶 Xho I 和 Xma I 酶切验证，结果显示，分别在约 4600 bp 和 669 bp 处各有一条带，大小与线性化载体及目的基因大小相一致（图 14B）。将其送测，把测序结果与目的基因序列一致的菌液进行扩大培养，提取其质粒用于拟南芥瞬时表达。



A. *PtCHI* 基因 PCR 扩增；**B**. 重组质粒 pSAT6-EYFP-N1-*PtCHI* 的双酶切产物。

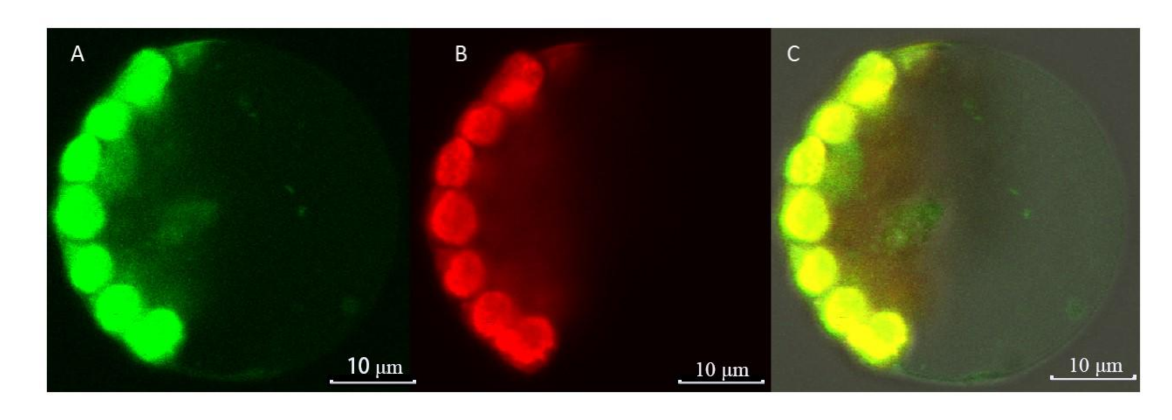
A. PCR amplification of *PtCHI*; **B**. Digestion product of pSAT6-EYFP-N1-*PtCHI*.

图 14 构建亚细胞定位重组质粒

Fig.14 Construction of subcellular localization recombinant plasmid

2.4.2 亚细胞定位分析

通过 PEG-CaCl2 法介导 pSAT6 -EYFP-N1-*PtCHI* 重组质粒转化拟南芥原生质体，转化 16h，通过激光共聚焦显微镜观察，*PtCHI* 结果显示在叶绿体周围检测到由 EYFP 通路发出的绿色荧光（图 15：A），及叶绿体自发的红色荧光（图 15：B）,表明 *PtCHI* 基因定位于叶绿体。



A：YFP 通道绿色荧光；**B**：Chloroplast 自发荧光；**C**：Merge。

A. YFP channel green fluorescence; **B**. Chloroplast autofluorescence; **C**. Merge.

图 15 *PtCHI* 的亚细胞定位

Fig. 15 Localiztion of *PtCHI*

3 讨论

3.1 粉葛和野葛的 *CHI* 基因表达与异黄酮类物质积累关系

异黄酮类物质作为葛根的主要活性成分，其含量高低也是葛根药用价值的评判标准之一。前人的研究发现，粉葛和野葛的总黄酮含量差异悬殊，且野葛的异黄酮类物质的含量显著高于粉葛。王新胜等（2009）对伏牛山区的野葛和粉葛药材质量测评结果表明，野葛的水浸出物和醇浸出物含量均高于粉葛，总黄酮含量是粉葛的 3 倍之多，且野葛中葛根素的平均含量是粉葛的 2.5 倍。蒙秋艳等（2020）对广西不同地区的野葛和粉葛总异黄酮含量研究结果可知，100 g 野葛粉末中总异黄酮含量约为 5.08 g·100 g^{-1}，显著高于粉葛中的总异黄酮含量 0.463 g·100 g^{-1}，且野葛中的葛根素含量和大豆苷含量也高于粉葛。张静等（2017）研究发现，广西野葛的纤维素、可溶性糖、总黄酮和葛根素含量显著高于粉葛。

查尔酮异构酶作为黄酮生物合成途径中第二大限速酶，在异黄酮类物质积累、色素合成、抗逆等具有重要作用（李琳玲等，2008；周发俊等，2008）。前人研究表明，在乌拉尔甘草中过表达其 *CHI* 基因，对其毛状根中总黄酮含量检测发现，转基因乌拉尔甘草的毛状根中总黄酮含量是 1.394 g·100 g^{-1} 显著高于 WT 的 0.842 g·100 g^{-1}，同时发现在 2 % PEG8000 和 0.1 %酵母提取物共处理下能显著提高转基因乌拉尔甘草毛状根中的总黄酮含量（2.838 g·100 g^{-1}）和机体内 CHI 基因的转录水平（Zhang et al., 2009）。针对改善土人参（*Talinum paniculatum* (*Jacq.)* Gaertn.）中总黄酮含量低的研究中发现，在土人参中过量表达大豆的 *GmCHI* 基因，会使得转基因土人参中总黄酮含量（2.74 mg·g^{-1} 和 4.24 mg·g^{-1}）比 WT 显著提高 4.8-7.4 倍（VU et al., 2018）。本研究发现野葛中的葛根素含量和总黄酮含量均高于粉葛，与前人的研究结果相一致。同时我们还发现，*CHI* 基因的表达量在野葛的根和茎中均显著高于粉葛，前人在乌拉尔甘草和土人参的研究中也发现，过表达 *CHI* 基因均能提高植株体内的总黄酮含量。推测葛根中的 *CHI* 基因与总黄酮及葛根素的积累存在密切联系。该研究结果对后续通过粉葛品质改良，提高其药效成分具有重要的参考价值。

3.2 野葛和粉葛 *CHI* 基因结构差异与异黄酮类物质积累关系

同一基因常会因结构存在差异从而使其行使的功能或者受到胁迫的表现也会有所不同（刘玉成等，2019）。前人在甘蔗的研究中发现，*ScJAZ* 家族基因中 *ScJAZ22*、*ScJAZ24* 和 *ScJAZ30* 基因结构、氨基酸数量和相对分子量差异较大，这三个基因在叶枯萎病侵染抗叶枯萎病品种 ROC22 的早期呈现不同的表达量，其中 *ScJAZ22* 基因的表达量下调，而 *ScJAZ24*

和 *ScJAZ30* 的表达量却上调（娄文月等，2021）。Dong 等(2021)在白梨中鉴定到了 197 个 *bHLH* 基因，其基因结构和编码的氨基酸数量以及外显子数量都存在差异，当在冷处理和热处理下，*PbrbHLH7*、*PbrbHLH8*、*PbrbHLH128*、*PbrbHLH160*、*PbrbHLH161* 和 *PbrbHLH195* 的表达量均上调，而其他成员的表达量则无显著变化。上述结果说明同一家族的基因，当其基因结构相互之间存在差异时，每个基因所表现出来的功能都会有所不同。

本研究所克隆的粉葛 *PtCHI* 基因 ORF 框长 672 bp，推导编码 223 个氨基酸，与 Yoshiya Terai 等(1996)在野葛中克隆的 PmCHI 的 ORF 框 675 bp 相差 3 bp，编码的氨基酸也相差 1 个。与野葛的氨基酸序列分析发现，粉葛中第 5 位的苯丙氨酸（Ala）缺失，但这个位点不是磷酸化位点，并且该位点也并非保守结构域位点。粉葛和野葛中的 *CHI* 基因 ORF 框长度和所编码的氨基酸数量存在差异，并且该基因在野葛和粉葛中的表达量存在显著差异，该研究结果与前人在甘蔗和白梨中的研究结果相似。两者的功能是否会存在差异？是否是引起野葛和粉葛的黄酮含量差异的原因？还有待进一步挖掘。

3.3 粉葛 *PtCHI* 亚细胞定位、互作关系与异黄酮类物质积累关系

本研究获得的粉葛 PtCHI 的氨基酸序列与野葛、大豆、乌拉尔甘草的 CHI 亲缘关系较近。CHS 和 CHI 发生互作在水稻、拟南芥、江南卷柏和小立碗藓等植物中已有报道（Ban et al., 2018 ）。Fujino 等（2018）发现金鱼草 *AmCHS* 和 *AmCHI* 定位于内质网和细胞核，并且 CHI 能与 CHS、FNSⅡ、F3H 及 DFR 发生蛋白互作，使β-半乳糖苷酶活性活性显著提高。Ban 等（2018）研究表明，啤酒花 CHIL2 和 CHS_H1 均定位于细胞质，并且能发生互作，在酵母中 CHS_H1/CHIL2 共表达提高代谢产物黄腐酚含量和槲皮素查尔酮含量比单独表达时提高 1.4 倍和 1.5 倍。Waki 等（2016）发现大豆 GmIFS 与 GmCHS1、GmCHS7、GmCHI1A、GmCHI1B2 和 GmCHI2 发生互作，其中 GmIFS 与 GmCHI 的互作强于 GmCHS；在同等条件下，GmIFS 与 GmCHI 共表达时的β-半乳糖苷酶活性活性也高于 GmCHS。Dastmalchi 等（2016）发现大豆 GmIFS1/GmIFS2 与 GmCHR14、GmCHI2、 GmCHS7、GmCHS8 均在细胞质发生互作，其中 GmIFS2 和 GmCHR14 互作时发出的荧光最强，与 GmCHS7/GmCHS8 的互作最弱。本研究结果表明葛根 *PtCHI* 仅定位于细胞质的叶绿体上，与前人研究结果不一致，可能是由于研究物种的不同从而导致定位的结果存在差异；且本研究预测粉葛 CHI 与 CHS、F3H 和 DFR2 互作，预测结果与前人在其他作物上的研究结果大体一致，这些互作蛋白都与花青素、花色素、木质素积累密切相关，但未检测到该基因与 PtIFS 存在互作关系。是否是基因之间存在 CHI 底物的竞争，导致 PtIFS 与 CHI 互作极低，进而导致粉葛异黄酮生物合成低？有待下一步深入研究。

参考文献

BAN Z, QIN H, MITCHELL AJ, et al., 2018. Noncatalytic chalcone isomerase-fold proteins in

Humulus lupulus are auxiliary components in prenylated flavonoid biosynthesis[J]. PROC NAT ACAD SCI USA, 115(22).

CHU JM, MA SY, LI HF, et al., 2015. Progress in Effective Components and Pharmacological Effects of *Puerariae Lobatea* Radix[J]. Food Drug, 17(2): 142-146. [楚纪明，马树运，李海峰，等, 2015. 葛根有效成分及其药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 17(2): 142-146.]

DASTMALCHI M, BERNARDS MA, DHAUBHADEL S, et al., 2016. Twin anchors of the soybean isoflavonoid metabolon: evidence for tethering of the complex to the endoplasmic reticulum by IFS and C4H[J]. PLANT J, 85(6): 689-706.

Dong HZ, Chen QM, Dai YQ, et al., 2021. Genome-wide identification of PbrbHLH family genes, and expression analysis in response to drought and cold stresses in pear (*Pyrus bretschneideri*)[J]. Plant Biol, 21(1).

Editorial Committee of the Chinese Academy of Sciences, 1995. Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 41: 219. [中国科学院中国植物志编辑委员会, 1995. 中国植物志[M].北京：科学出版社，41: 219.]

FUJINO N, TENMA N, WAKI T, et al., 2018. Physical interactions among flavonoid enzymes in snapdragon and torenia reveal the diversity in the flavonoid metabolon organization of different plant species[J]. Plant J, 94(2): 372-392.

GUO JY, 2011. Cloning and function analysis of chalcone isomerase gene from purple-fleshed sweet potato[*Ipomoea batatas*(L.) Lam][D]. Chongqing: Southwest University: 63-83. [郭晋雅, 2011. 紫心甘薯查尔酮异构酶基因的克隆及其功能分析[D]. 重庆：西南大学: 63-83.]

GUO DD, 2019. Characterization and function study of key genes involved in flavonoid biosynthetic pathway in *Carthamus tinctorrius* L.[D]. Shanghai: Naval Medical University: 61-62. [郭丹丹, 2019. 红花黄酮类成分生物合成途径关键基因的特征和功能研究[D]. 上海：中国人民解放军海军军医大学: 61-62.]

HE ZM, 2018.Cloning and Function Verification of Chalcone Isomerase Gene *GmCHI4A* and *GmCHI4B* in Soybean[D]. Changchun: Jilin University: 46-56. [何则铭, 2018. 大豆查尔酮异构酶 *GmCHI4A* 和 *GmCHI4B* 基因的克隆及功能验证[D]. 长春：吉林大学: 46-56.]

HE CY, GAN L, YAN MJ, et al., 2018. Cloning, Functional and Expression Analysis of Chalcone Synthase Gene *PpCHS1* in *Kentucky Bluegrass*[J]. Chin J Grassland, 40(4): 8-15. [何春艳，甘露，闫蒙举，等, 2018. 草地早熟禾查尔酮合成酶基因 *PpCHS1* 克隆、功能与表达分析[J]. 中国草地学报, 40(4): 8-15.]

LI GH, FU M, LUO LW, et al., 2021. Comprehensive analysis of the nutritional quality of *Pueraria*

montana [J]. Guangdong Agric Sci, 48(9): 72-80. [李桂花，符梅，罗文龙，等, 2021. 粉葛资源营养品质综合分析[J]. 广东农业科学, 48(9): 72-80.]

LI LL, CHENG H, XU F, et al., 2008. Progress of chalcone isomerase in plants[J]. Letters in Biotechnol, (6): 935-937. [李琳玲，程华，许锋，等, 2008. 植物查尔酮异构酶研究进展[J]. 生物技术通讯, (6): 935-937.]

LI HY, 2019. Cloning and Function Analysis of The Key Enzyme Genes Involved in The Flavonoids Boosythesis in *Salvia Miltiorrhiza*[D]. Xianyang: Northwest A&F University: 48-49. [李红艳, 2019. 丹参类黄酮合成途径关键酶基因的克隆与功能分析[D]. 咸阳：西北农林科技大学: 48-49.]

LING JJ, 2016. Molecular Cloning and Characterization of Chalcone Isomerase Genes in *Freesia hybrida*[D]. Changchun: Northeast Normal University: 7-9. [梁瓴婕, 2016. 香雪兰查尔酮异构酶基因家族的克隆及功能分析[D]. 长春：东北师范大学: 7-9.]

LI ZF, WU RF, 2008. Study on extracting total Puerarin flavonoids[J].Appl Chem Industry, 37(11):4. [李增富，吴荣锋， 2008. 葛根总黄酮的提取研究[J]. 应用化工, 37(11): 4.]

Liu YC, Zhang C, Dong B, et al., 2019. Advances of CCD subfamily in higher plants[J]. J Agric Biotechnol, 27(4): 720-734. [刘玉成，张超，董彬，等, 2019. 高等植物 CCD 亚家族基因研究进展[J]. 农业生物技术学报, 27(4): 720-734.]

Lou WY, Sun TT, Cen GL, et al., 2021. Identification and expression analysis of the sugarcane *ScJAZ* gene family based on transcriptome[J]. Mol Plant Breed. 19(7): 2142-2155. [娄文月，孙婷婷，岑光莉，等, 2021. 基于转录组的甘蔗 *ScJAZ* 基因家族鉴定及表达分析[J].分子植物育种, 19(7): 2142-2155.]

MA Z, 2018. Research progress of key enzyme chalcone synthase in flower color formation of ornamental plants[J]. For Ecol Sci, 33(1): 7-10. [马喆, 2018. 观赏植物花色形成关键酶查尔酮合成酶研究进展[J]. 林业与生态科学, 33(1): 7-10.]

MENG QY, HUANG JZ, LING YL, et al., 2020. Comparison of polysaccharides and isoflavones in *Pueraria thomsonii* and *Pueraria montana* from different producing areas of Guangxi[J]. Food Res Dev, v.41; No.394(21): 51-58.[蒙秋艳，黄靖洲，梁艳玲，等, 2020. 广西不同产地粉葛,野葛的多糖和异黄酮含量比较[J]. 食品研究与开发, v.41; No.394(21): 51-58.]

SHANG XH, CAO S, YAN HB, et al., 2021. Development status and countermeasures of *Pueraria montana*(Wild.) Ohwi var. *Thomsoni*(Benth.) van der Maesen industry in Guangxi[J]. J South Agri, 52(06): 1510-1519. [尚小红，曹升，严华兵，等, 2021. 广西粉葛产业现状分析及其发展建议[J]. 南方农业学报, 52(06): 1510-1519.]

VU TNT, LE THT, HOANG PH, et al., 2018. Overexpression of the Glycine max chalcone isomerase (*GmCHI*) gene in transgenic Talinum paniculatum plants[J]. TURK J BOT, 42(5): 551-558.

WANG Y, XU F, CHENG SY, 2007.Research progress in molecular biology of plant chalcone synthase[J]. J Henan Agric Sci, (08): 5-9. [王燕,许锋,程水源, 2007. 植物查尔酮合成酶分子生物学研究进展[J]. 河南农业科学, (08): 5-9.]

WANG XS, WU YF, ZHANG YP, et al., 2009. Quality evaluation of *Pueraria Montana(Willd.)* Ohwi and *Pueraria Thomsonii* Behth. from Funiu Mountain[J]. J Henan Univ Sci Technol (Nat Sci Ed), 30(5):67-69. [王新胜, 吴艳芳, 张延萍, 等, 2009. 伏牛山区野葛与粉葛药材质量综合研究[J]. 河南科技大学学报(自然科学版), 30(5): 67-69.]

WAKI T, YOO D, FUJINO N, et al., 2016. Identification of protein–protein interactions of isoflavonoid biosynthetic enzymes with 2-hydroxyisoflavanone synthase in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)[J]. Biochem Biophys Res Comm, 469(3): 546-551.

XIA F, LI HH, FU CX, et al., 2011. Cloning, expression and charaterization of chalcone synthase from *Saussurea medusa*[J]. Chin J Biotechnol, 27(9): 363-370. [夏芳, 李厚华, 付春祥, 等, 2011. 水母雪莲查尔酮合酶基因的克隆、表达及酶活分析[J]. 生物工程学报, 27(9): 363-370.]

YU QH, DU YQ, SUN QH, et al., 2021. Research progress on antipyretic and antiviral effects of Yege(*Pueraria montana*) and Fenge(*Pueraria thomsonii* Benth) based on efficacy and material basis[J]. Chin Arch Trad Chin Med, 39(9): 89-94. [于钦辉, 杜以晴, 孙启慧, 等, 2021. 基于功效和物质基础的野葛、粉葛解热和抗病毒作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 39(9): 89-94.]

YU JB, LI YT, ZHANG J, et al., 2021. Cloning and construction of plant expression vector of chalcone synthase gene *PtCHS* in *Pueraria* var. *Thomsonii*[J]. Mol Plant Breed, 19(4): 1143-1149. [羽健宾, 李钰婷, 张静, 等, 2021. 粉葛查尔酮合成酶基因 *PtCHS* 的克隆与植物表达载体构建[J]. 分子植物育种, 19(4): 1143-1149.]

YOSHIYA Terai, ISAO Fujii, Soon-He Byun, et al., 1996. Cloning of chalcone–flavanone isomerase cDNA from *Pueraria montana* and its overexpression in *Escherichia coli*[J]. Protein Expres Purif, 8(2): 183-190.

ZJOU FJ, WANG YQ, CHEN YQ, 2008. Progress of Plant Chalcone Isomerase[J]. J Hebei Norm Univ Sci & Technol, (1): 73-77.[周发俊, 王逸群, 陈由强, 2008. 植物查尔酮异构酶分子生物学研究进展(综述)[J]. 河北科技师范学院学报, (1): 73-77.]

ZHANG DQ, TAN XF, WANG XH, 2007. Gene characteristics and transgenic application of chalcone synthase and chalcone isomerase[J]. J Centr S Univ For Technol, 27(2): 87-91.[张党权, 谭晓风, 王晓红, 2007. 查尔酮合酶与查尔酮异构酶基因特征及转基因应用[J]. 中南林业科技大学学

报, 27(2): 87-91.]

ZHANG HC, LIU JM, LU HY, et al., 2009. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment[J]. Plant Cell Rep, 28(8): 1205-1213.